

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**EVALUACION DE LA EFICACIA DE
PRESERVANTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS
EN LA ELABORACION DE SUSPENSIONES
ANTIAMEBIANAS, EN LA INDUSTRIA
FARMACEUTICA GUATEMALTECA**



Informe de Tesis

Presentado por

GUILLERMO SOLORZANO GANDARA

Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, Agosto de 1994.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
06
T(1647)

JUNTA DIRECTIVA
DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIA	LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	BR. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS** Señor Todopoderoso muy misericordioso, por tu infinita bondad hoy llego al final de Esta carrera.
- A MIS PADRES** Carlos Solórzano, Carmen Gándara de Solórzano, y Graciela Monroy de Solórzano, como un tributo a toda una vida de sacrificios y esfuerzos mutuos.
- A MIS HERMANOS** Juan Elias, y Carlos, como un tributo a su presencia tan importante en mi vida.
- A MIS CATEDRATICOS** Rose Marie Sandoval, Fernando Díaz, Mario Casado, Jorge Pérez, Gerardo Arroyo, Maria del Carmen Bran, Heidi Logeman, Ruben Velázquez, Miguel Torres, y Armando Cáceres con agradecimiento por lo que me enseñaron.
- A LA PROMOCION DE Q.B.'S 1990, Y EN ESPECIAL A** Felix Mendizabal, Francisco Boburg, Carlos Raul Montes, Hector Contreras, Luisa Fernanda Barrientos y Nancy Quan, gracias por su amistad y apoyo infinitos.
- A MIS AMIGOS** Rodolfo Lainfiesta y Luis Alfredo García, Manuel Fagiani y familia en especial al Lic. Carlos Fagiani (Q.E.P.D.) a quienes brindo este acto como agradecimiento y tributo a su confianza.

TESIS QUE DEDICO

- A DIOS Señor Todopoderoso muy misericordioso, por tu infinita bondad hoy llego al final de esta carrera.
- A MI PAIS Guatemala, y a mi pueblo de belleza natural e incomparable.
- A LA USAC Gloriosa, tricentenaria revolucionaria, grande entre las del mundo.
- A LA FACULTAD De Ciencias Químicas y Farmacia, como una de las mejores facultades de la Universidad de San Carlos.
- A MIS ASESORA Licda. Karin Herrera, gracias por su apoyo y ayuda.
- A TODAS las personas que de una u otra forma estan en el camino, exhortandoles a ver siempre hacia adelante y nunca más hacia atras, ya que el futuro como profesionales es solo nuestro para construirlo.

AGRADECIMIENTOS

- A laboratorios Laprin S.A. por financiar la parte experimental de este estudio, en costo de reactivos, medios de cultivo, así como uso de sus instalaciones.
- A Alimentos Kern de Guatemala S.A., por permitirme realizar en sus instalaciones la parte final de este estudio.
- A todas las personas que con su ayuda desinteresada hicieron posible la realización de este estudio.

INDICE

	pag.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
4. JUSTIFICACION	21
5. OBJETIVOS	22
6. HIPOTESIS	23
7. MATERIALES Y METODOS	24
8. RESULTADOS	31
9. DISCUSION DE RESULTADOS	33
10. CONCLUSIONES	35
11. RECOMENDACIONES	36
12. REFERENCIAS	37
13. ANEXOS	40

1. RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la eficacia del preservante o sistema de preservantes empleados en la elaboración de suspensiones antiamebianas por la industria farmacéutica nacional.

Por medio de la prueba de evaluación de la eficacia de preservantes descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos USP XXII. Se tomaron treinta muestras en distintas farmacias de la capital, realizándose las determinaciones por cuatruplicado. El conteo aeróbico en placa inicial fue menor de < 10 UFC/ ml para el total de las muestras analizadas lo que se considera un buen seguimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura, cumpliendo además con lo considerado en las Normas Guatemaltecas obligatorias para esta clase de productos farmacéuticos. Se debe considerar que la adición de un exceso de preservantes durante el proceso de manufactura puede enmascarar en cierta forma el significado de los resultados obtenidos.

Todas las suspensiones utilizadas en las evaluaciones fueron capaces de reducir el inóculo inicial en el día 14 de incubación excepto dos suspensiones de diyodohidroxiquinoleína, que lo hicieron al día 21 de incubación conteniendo el inóculo de Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027. En este caso lo redujo en más del 90 por ciento por lo que el preservante o sistema de preservantes empleados en su manufactura se consideran eficaces. Se concluye que estos productos pueden sufrir contaminación en su proceso de manufactura o por factores externos donde participa directamente el usuario por lo que su estricto control y seguimiento se hace necesario.

2. INTRODUCCION

Según el boletín de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la amebiasis ocupa una tasa alta de incidencia como enfermedad diarreica y mortalidad en niños menores de dos años; siendo ésta de 18.45/100,000 habitantes. Las suspensiones antiamebianas son productos farmacéuticos necesarios para combatir lo anteriormente expuesto.

Su control de calidad debe ser un objetivo principal de las autoridades sanitarias de cada país (1).

Surge así la necesidad de promover estudios que reflejen la calidad microbiológica del producto que los laboratorios nacionales ofrecen al consumidor a través de la evaluación de la capacidad que tiene un producto de resistir una eventual contaminación bacteriana, evaluando así, el cumplimiento de la Normas Microbiológicas Guatemaltecas; así como de las Buenas Prácticas de Manufactura.

El presente estudio se realizó en una industria privada farmacéutica; los resultados se compararán con las normas Guatemaltecas Obligatorias.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

En algunos estudios publicados se evalúa la acción de los preservantes antimicrobianos y se concluye sobre varios aspectos relacionados con su uso en diferentes productos (2).

No se tiene información sobre algún trabajo anterior relacionado con evaluación de preservantes en suspensiones antiamebianas.

Un preservante antimicrobiano es agregado para proteger de la contaminación microbiológica que pueda sufrir un producto durante su manufactura, distribución, o empleo del mismo, ya que puede constituirse en riesgo para el consumidor en caso de que no cumpla con las normas de calidad establecidas en cada país.

3.2 Amebiasis

La amebiasis en países tropicales como Guatemala es una de las principales enfermedades. De tipo diarreica, eventualmete disentérica, típica por causar vómitos, náusea, calambres intestinales, y diarrea con moco y sangre. Es difícil su diagnóstico conclusivo por la dificultad de encontrar los quistes del agente causal Entamoeba histolytica (3). Es una enfermedad causante de muerte frecuente por deshidratación en niños menores de dos años; no comparandose con la magnitud que causa la diarrea originada por Vibrio cholerae que actualmente afecta drásticamente a la población guatemalteca. Su diagnóstico diferencial con shigellosis, enfermedad de etiología diferente pero por sus síntomas similares, es de suma importancia; siendo a la vez su adecuado y oportuno tratamiento (3).

Su forma de transmisión es usualmente por el consumo de alimentos contaminados y agua contaminada, en niños y adultos.

En niños usualmente por que se llevan a la boca cualquier elemento contaminado con quistes de Entamoeba histolytica los cuáles al encontrarse en condiciones apropiadas en el intestino, desenquistando dando lugar a los trofozoítos, provistos de diferentes enzimas líticas capaces de destruir tejidos y penetrar a sitios extraintestinales tales como hígado y pulmón. Este microorganismo patógeno es causante de disentería amebiana con secuelas de deshidratación y muerte frecuentes (3).

3.3 Tratamiento de la Amebiasis

El tratamiento quimioterapéutico de la amebiasis se basa en la administración de principios activos farmacéuticos, tales como el metronidazol, diyohidroxiquinoleina, y tinidazol, que pueden ser en comprimidos, suspensión u óvulos, dependiendo de la edad del paciente, su capacidad de asimilar y tomar el tratamiento, edad, peso, etc. (4).

El metronidazol es un derivado sintético nitroimidazólico con efecto bactericida, amebicida, y tricomonicida; esta desionizado a pH fisiológico y es absorbido rápidamente por microorganismos anaerobios, posteriormente es reducido por el sistema de oxido-reducción y transporte de electrones de las células, a sub-productos los cuales poseen el grupo amino, el cual es responsable de la acción citotóxica y antimicrobiana que incluye la ruptura del ADN e inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos. El Metronidazol actúa como amebicida de contacto y tisular, ya que es activo contra los trofozoítos en el intestino, y sitios extraintestinales tales como el hígado y pulmones.

El centro para el control de las enfermedades (CDC), en Atlanta, Estados Unidos, considera al Metronidazol como el tratamiento de elección para la amebiasis sintomática, y recomienda su uso

concomitante con otro amebicida luminal de contacto tal como las quinoleínas (5).

La diiodohidroxiquinoleína, es una 8-hidroxiquinoleína halogenada, con efecto amebicida especialmente contra Entamoeba histolytica en ambos estadios, de quiste y trofozoíto, por método de contacto. No se absorbe gran parte de la droga en el tracto gastrointestinal, por lo que cierta cantidad es expulsada en la heces. No se ha observado niveles altos de iodo en sangre, después de la absorción de una dosis (5).

Se cree que es un amebicida de tratamiento para portadores asintomáticos de quistes, pero no para el tratamiento de una amebiasis intraintestinal aguda o extraintestinal (5).

El tinidazol es un derivado de los compuestos imidazólicos, con nombre químico (2-[etilsulfonil]-etil)-2-metil-5-nitroimidazol, relativamente insoluble en agua, con actividad antiprotozoaria y antianaeróbica; se absorbe rápidamente y los niveles séricos pico usualmente se presentan dos horas después de la administración y declinan lentamente con vida media de 12 a 14 horas, es excretado mayormente en la orina y menos en las heces, en proporción 5 a 1; por lo que se considera como un amebicida de contacto y sistémico, de amplio espectro ya que puede pasar eficazmente la barrera hematoencefálica. Actúa similarmente al metronidazol en el interior de la célula, básicamente como se menciona rompiendo el ADN, e inhibiendo la síntesis de los Acidos Nucleicos (4).

3.4 Suspensiones

Las suspensiones son sistemas heterogéneos que consisten de dos fases. Una fase continua o externa que es generalmente líquida y una fase dispersa o interna que esta constituida por partículas que son insolubles, y que a su vez están suspendidas en la fase continua. Estas constituyen un sistema de dos fases, que guardan cierto equilibrio, en la cuál una esta distribuída en la otra dando una homogeneidad durante su agitación, promoviendo la dosis requerida para el tratamiento del paciente (4).

Existen fuerzas de interacción entre los componentes de una suspensión, y una cinética química inherente a cada partícula que determina el comportamiento de la fórmula final en la suspensión, como se menciona anteriormente, entre mayor número de componenetes se tiene en una suspensión es más difícil preveer su comportamiento químico y de que forma interactuará cada uno de los componentes entre sí. Por lo tanto debe existir un equilibrio de carga total entre partículas para que no reaccionen entre sí y se forme un sedimento indispersable con su agitación, que pueda eventualmente significar la anulación de los principios activos y/o los preservantes, promoviendo, un alto riesgo de susceptibilidad por parte del producto a contaminarse (6).

3.5 Suspensiones Antiamebianas

La industria farmacéutica elabora una gama de suspensiones antiamebianas, que usualmente son de uso pediátrico por su facilidad de administración en comparación con los comprimidos, ya que estos representan peligro en niños que aun no pueden tragar, y tambien en cuanto a la dosificación del principio activo (4).

Actualmente en Guatemala existen 24 laboratorios nacionales que producen suspensiones de metronidazol, 11 que elaboran suspensiones de diyodohidroxiquinoleína, y uno que elabora suspensión de tinidazol y que también según el Centro Guatemalteco de Información de Medicamentos (CEGIMED) poseen registro en la Dirección General de Servicios de Salud; siendo estos tres últimos los principios activos más usados comúnmente en el tratamiento de amebiasis en niños menores de dos años (7).

Además existen otros principios activos elaborados también como Cloroquina, Secnezol, Ornidazol, Hemezol etc., pero su uso es menos frecuente; y que para efectos de estudio son productos importados por laboratorios trasnacionales (7).

3.6 Evaluación de la seguridad Microbiológica de los productos farmacéuticos

La gran variedad de productos farmacéuticos, así como el cambio y desarrollo en la industria farmacéutica, el desarrollo de productos nuevos, la modernización en la infraestructura de la manufactura de los mismos, un número grande de los componentes de los lotes, las materias primas usadas, y el incremento en el uso de ingredientes naturales, demandan el desarrollo e implementación de programas extensos de evaluación microbiológica para asegurar la pureza microbiológica de los mismos. También se debe pensar en especificaciones para materia prima, componentes extras, producto terminado, así como programas de muestreo de producto durante y al final del proceso. Es importante que exista un cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura así como un programa de supervisión

que refuerze los procedimientos de sanitización y limpieza el cuál además se complementa con un programa de evaluación de la eficacia de los preservantes (8).

Varios procedimientos han sido desarrollados para la evaluación de la eficacia de los preservantes y son considerados por la Asociación de Cosméticos y Productos de Tocador (Cosmetics & Toiletries Fragrance Association) CTFA, los cuales indican que la mayoría de industrias los usan con algunas modificaciones, incluyendo microorganismos "caseros", que han sido aislados en la misma industria. De esta manera la prueba se ajusta a sus necesidades, diferenciándose los productos que están pobremente preservados, marginalmente preservados, y bien preservados, se describe esta clasificación en cuanto a la naturaleza del producto y a los resultados de la prueba o sea su capacidad de reducir el inóculo de bacterias, mohos y levaduras que se les inocula (8, 9).

Entre los métodos para evaluar la efectividad de los preservantes antimicrobianos están los siguientes:

3.6.1 Método de Referencia

Establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), consiste en la inoculación de las muestras con los microorganismos de prueba, por un período de 28 días realizándose conteos a los 7, 14, 21 y 28 días, en donde se establecen diferencias entre los conteos cada lapso, a partir del inóculo inicial (6).

3.6.2 Método CTFA:

Establecido por la Asociación de Cosméticos aguas de Colonia y Fragancia; se evalúa la reducción de los microorganismos en muestras previamente inoculadas. Es necesario efectuar un análisis comparativo determinando la efectividad del preservante (10).

3.6.3 Métodos Rápidos:

Se han implementado los procedimientos de tamizaje con el fin de detectar formulaciones que no se han evaluado para acelerar la selección de formulaciones efectivas con la concentración óptima del preservante y para monitorear niveles de preservantes de alta estabilidad, éstos a su vez son una modificación del método de referencia establecido por la USP. Entre estos podemos mencionar:

3.6.3.1 Método de regresión lineal:

Describe la reducción de microorganismos en términos del valor "D", el cuál es definido como el tiempo requerido para la inactivación del 90 por ciento de la carga de microorganismos expuestos a un agente letal. Se calcula a través de la razón de muerte logarítmica por lo que es un método cuantitativo. Es poco confiable cuando se evalúa la efectividad del preservante con cepas resistentes (11).

3.6.3.2 Método de Reto y muerte rápida:

Determina la tasa de muerte a través de muestreos frecuentes después de inocular la primera muestra, se diluyen las siguientes en una forma seriada, y luego de inoculadas se traspasan a caldo desactivador de preservantes, se realiza Conteo Aeróbico en Placa, y se determina las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro.

Es un método semicuantitativo, requiere muestras pequeñas para los ensayos y los resultados se obtienen aproximadamente a las 48 horas (12).

3.6.3.3 Método presuntivo de desafío

Es una adaptación del test MIC (concentración inhibitoria mínima). Se utiliza para detectar la presencia de sinergismo entre preservantes. Determina la menor concentración del agente antimicrobiano que pueda

inhibir el crecimiento del microorganismo evaluado; para ello se incorpora a través de discos impregnados un agente antimicrobiano cuya concentración es conocida en un medio de cultivo previamente inoculado para determinar si el microorganismo es inhibido a las 24 horas de incubación por el agente evaluado (13, 14).

3.7 Preservantes antimicrobianos

Un preservante antimicrobiano es un agente que protege un producto, una fórmula o un grupo de principios activos de cualquier degradación microbiológica que puede ser causada por agentes contaminantes adquiridos durante el proceso de manufactura, empaque, etc., hasta cuando llega a las manos del consumidor (6, 8).

Los preservantes fueron introducidos a la industria farmacéutica cuando se manufacturaron productos de alto riesgo debido a su alta susceptibilidad de contaminarse durante el proceso de manufactura, llenado y empaque.

Los parabenos (metil y propil parabeno) fueron los primeros preservantes usados debido a su actividad antifúngica, para combatir el crecimiento de mohos en las industrias farmacéuticas en los años cuarenta. Estos son todavía los preservantes más comúnmente usados; ver anexo 3 (8, 15).

Los preservantes son agregados a una fórmula por tres razones principales:

- 1) Mantener la integridad del producto durante su uso por el consumidor.
- 2) Extender la estabilidad del producto.
- 3) Prevenir el crecimiento microbiano durante su manufactura.

Las posibilidades de introducir microorganismos en el producto durante su manufactura puede ser minimizado por el establecimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura, en donde los preservantes deben ser utilizados para asegurar la integridad del producto, y no para eliminar cualquier crecimiento microbiano como resultado de una contaminación durante el proceso, ni mucho menos para sustituir estas Buenas Prácticas en la Industria, las cuales deben estar reforzadas por efectivos programas de limpieza y sanitización, eliminando el uso en exceso de sistemas de preservantes, con el riesgo de causar irritación en el consumidor por sensibilización al preservante, provocando reacciones inflamatorias adversas, y otras (14).

3.8 El Preservante Ideal

Un preservante ideal ha sido definido como un agente antimicrobiano que cumple con los siguientes puntos:

- 3.8.1 Tiene un amplio espectro antibacteriano y antifúngico.
- 3.8.2 Es activo en bajas concentraciones y en un amplio rango de pH.
- 3.8.3 No es tóxico, irritante o sensibilizante.
- 3.8.4 Es compatible con la formulación del producto y su embalaje.
- 3.8.5 Es soluble en agua y produce una adecuada concentración en la fase acuosa, tiene un bajo coeficiente de partición para la fase aceitosa, por lo que una gran cantidad permanece en la fase acuosa donde la mayoría de los microorganismos pueden proliferar (8).
- 3.8.6 Es rentable (6, 8).

3.9 Preservantes comunmente utilizados

A través de las décadas pasadas pueden observarse pocos cambios en el uso de los preservantes; los parabenos (metil y propil parabeno) son todavía los agentes mas usados, el uso de la imidazolidinil-urea ha aumentado, el uso del formaldehido ha disminuido. El uso de las tiaolinonas y la diazolidinil-urea fué introducido en la década pasada; otros más recientes son el Euxil K 400 (metil di bromo glutaronitrilo y fenoxietanol) y el Euxil K 100 (benzil alcohol y tiazolinonas) (15).

Aunque existe la necesidad de nuevos preservantes, después de 50 años los parabenos son usados frecuentemente; debido a su relativamente baja toxicidad y excelente historia de preservación (ver anexo 3).

3.10 Factores que afectan la actividad preservante

Muchas sustancias que son utilizadas como nuevos ingredientes de las fórmulas tradicionales de productos farmacéuticos pueden de cierta forma inhibir la acción antimicrobiana promovida por los preservantes, tal como materias primas provenientes de la actual biotecnología, el uso incrementado de emulsiones pueden afectar el coeficiente de partición de tal forma que los preservantes no son lo suficientemente activos para inhibir la acción microbiana. Es así como en una fórmula entre más ingredientes se tienen, hay más probabilidades de que exista interferencia en el sistema de preservantes utilizados, por lo que el investigador primero tiene que determinar y estudiar el papel de todas las materias primas en la fórmula, incluyendo nuevos activos, en relación con el sistema de preservantes escogido y segundo trabajar con el formulador para desarrollar una fórmula que reúna todas las cualidades de un sistema de preservantes ideales (16).

Se deben estudiar todas las materias primas por separado y determinar su capacidad de servir como medio de cultivo para cualquier microorganismo, lo que sirve también para determinar incompatibilidades las cuales independientemente pueden causar cambios en el color, pH, o cristalización del producto ya que cada materia prima puede interactuar de diferente manera con un sistema de preservantes en una fórmula considerando los siguientes factores:

- a) La concentración de ciertos activos por ejemplo el alcohol al 1 por ciento puede servir como fuente de carbono y ser de gran daño al sistema de preservantes,
- b) Cambios en la fórmula,
- c) El orden en que todos los componentes son agregados,
- d) Actividad por humedad, en la que el uso de materias primas osmóticamente controladas puede ayudar a reducirla. Esta difiere del contenido de agua total pero en ambos casos, representa factores de alto riesgo ya que los microorganismos necesitan el agua para multiplicarse.

Janet Curry estableció un valor intrínseco de 0.98 como óptimo para el desarrollo bacteriano, así que una formulación debería contener una actividad por humedad, menor de 0.98 y preferiblemente menor de 0.95 (17).

- e) El material de empaque; el tipo de sellado puede tener una contribución decisiva a la hora de considerar la fórmula y el sistema de preservantes evaluados, desde el punto de vista de evaporación de preservantes, descomposición por la luz de las materias primas, reacción con el material de empaque, etc.

Se ha demostrado que la misma fórmula puede requerir un sistema de

preservantes diferente si se cambia su material de empaque tradicional (16).

f) El pH: La mayoría de los preservantes ionizables se ven influenciados grandemente por los cambios de pH, dicha actividad reside generalmente en la molécula neutra o en las especies ionizadas, en donde por cambios propios de la fórmula si no se tienen en cuenta, ocurre una desactivación total de los mismos (16).

3.11 Adaptación Microbiológica

Se sabe que ciertos microorganismos pueden fácilmente adaptarse a los preservantes, pudiendo causar el deterioro del producto, y un daño directo al usuario, causando la necesidad de cambiar el sistema de preservantes utilizados (18). Borovian demostró la adaptabilidad de Pseudomonas cepacia a dos sistemas de preservantes como lo son el formaldehido y el acido benzóico (19).

Close & Nielsen demostraron la habilidad de una cepa de Pseudomonas cepacia aislada de una emulsión aceite en agua que contenía metil y propil parabeno, capaz de usar el éster de propilo como una fuente de carbono, y de hidrolizar el metilparabeno haciendo a estos preservantes inefectivos (20).

Scotty Jungermann, demostraron por análisis químico las diferencias significativas entre las cantidades de metil y propil parabeno destruídas por una cepa de Pseudomonas aeruginosa contra una cepa ATCC estandar, en un lapso de ocho días (21).

Además de esto hay que considerar muchos factores más que intervienen en el uso o consideración de un preservante tales como: su acción sinérgica al ser utilizados en forma combinada, el desarrollo de grupos funcionales específicos que aumentan la actividad antimicrobiana, el uso de preservantes naturales, estudios de bioingeniería, etc. (21).

3.12 Normas microbiológicas Guatemaltecas que se deben tomar en cuenta por las industrias farmacéuticas en la elaboración de suspensiones antiamebianas.

La elaboración de suspensiones antiamebianas por farmacéuticas persigue varios fines en particular que atienden también a intereses particulares. Estos productos se sujetan a normas que las clasifican como productos farmacéuticos los cuales deben tener un registro farmacéutico ante la Dirección General de Servicios de Salud; representados por un regente Químico Farmacéutico, colegiado, que asume la responsabilidad por la calidad microbiológica de los productos bajo su tutela o representación (7).

Bajo el anterior concepto, la calidad microbiológica de todos los productos farmacéuticos nacionales que se expenden debe estar asegurada que cumpla con las Normas Obligatorias Nacionales, y que contenga la cantidad exacta prescrita en su inserto o monografía identificatoria, así mismo que su calidad microbiológica sea óptima, desde su manufactura, hasta que llega finalmente a las manos del consumidor (22),

Todo esto se traduce en que cuando se haga uso de estos productos se repondrá la salud perdida, y no se estará ingresando otra enfermedad por que éstos estén contaminados, debido a que no cumplen con lo considerado anteriormente; atentando seriamente contra la salud, constituyéndose en un peligro, en general, para toda la población (4).

Refiriéndose a la norma oficial para productos farmacéuticos, editada por la Comisión Guatemalteca de normas COGUANOR número NGO 6 044, se encuentran varios factores considerados en la presente, que deben ser tomados en cuenta por las industrias farmacéuticas, ejemplo son el origen de las materias primas, la composición de las formas farmacéuticas, los procedimientos de manufactura, la higiene, y además, los requerimientos microbiológicos que debe exigírseles, categorías en las que pueden clasificarse etc. (ver anexo 2).

Atendiendo a esta norma, las suspensiones antiamebianas pueden clasificarse en la segunda categoría, como "preparaciones orales que contienen antibióticos"; y sus requerimientos microbiológicos son : "Ausencia de microorganismos viables en un gramo ó en un mililitro de suspensión" (22).

De lo anteriormente considerado se traduce la importancia que tiene el estricto control de suspensiones que contienen antibióticos como lo son las suspensiones antiamebianas, ya que pueden introducir de forma directa, agentes potenciales de infección extras a huéspedes previamente sensibilizados o con defensas disminuídas por una infección inicial (23).

3.13 Relación de los microorganismos seleccionados en la prueba de Evaluación de preservantes con el producto de prueba y su significado con los resultados obtenidos.

Con el test de evaluación de preservantes, se obtiene representación de como se comportará el producto evaluado cuando por cualquier circunstancia enfrente una carga microbiana. Esta puede derivarse de no seguimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura, mal control de las materias primas susceptibles a contaminación, inadecuada concentración de preservantes antimicrobianos. Otra fuente puede encontrarse en las manos del consumidor, que contaminan el producto por inadecuado uso del mismo con la proliferación de cualquier microorganismo que dependiendo de su carga, y del estado inmunológico y de compromiso del paciente, puede tener efectos nocivos como estar inoculando una infección sobre otra infección (23).

Desde el punto de vista microbiológico se seleccionan cinco microorganismos patógenos para el ser humano por lo que un resultado satisfactorio de la prueba evidencia la capacidad que tiene el preservante o sistema de preservantes empleados en la manufactura del producto de evitar independientemente de su origen, cualquier contaminación del mismo, asegurando así, el uso sin riesgo por parte del paciente (6). Se considera que un producto que no pasa la evaluación de preservantes, tiene un preservante o sistema de preservantes inadecuado, no pudiendo así asegurar la calidad microbiológica del mismo, esto no significa que haya sido elaborado bajo las Buenas Prácticas de Manufactura pero si, lo identifica como muy susceptible a posibles post-contaminaciones, constituyendose como riesgo para su usuario (6).

Se consideran algunos aspectos relacionados con la microbiología de estos microorganismos siendo los siguientes.

3.13.1 Cocos Gram positivo: Staphylococcus aureus es recomendado porque representa a los cocos gram positivo y es un microorganismo patógeno común en la piel; es usado rutinariamente en evaluación de desinfectantes y antisépticos, adicionalmente muchos productos entran durante su manufactura en contacto con este microorganismo; su presencia indica contacto del producto con el operario (piel), o con superficies mal sanitizadas y/o desinfectadas, del área de manufactura.

Reconocido históricamente como un virulento e importante patógeno humano, su capacidad de producir infección en el huésped humano no ha disminuido a pesar de la introducción de antibióticos. Puede ser recuperado de 10 a 15 por ciento en personas sanas en distintas partes de la piel. Produce una citotoxina neurotóxica causante de envenenamiento alimenticio, con la aparición de vómitos, diarrea, y calambres abdominales de 2 a 4 horas después de ingerido el alimento contaminado (23).

3.13.2 Bacilos fermentadores gram negativo: Escherichia coli representa el grupo de enterobacterias, se recomienda su uso ya que indica un índice de contaminación fecal, y representa la resistencia de las bacterias coliformes. Es un agente importante de gastroenteritis humana. Asociada con enfermedades como diarrea del viajero, es un importante causante de morbilidad en toda América. Sus mecanismos de virulencia incluyen la producción de enterotoxinas similares a las de Vibrio cholerae, invasividad, producción de citotoxinas y adherencia. Se han asociado brotes epidémicos con Escherichia coli enteropatógena

(EPEC). La producción de tóxicas es llevada mediante un plásmido de resistencia transmitido genéticamente de cepa a cepa. La diarrea producida por Escherichia coli enterotóxigenica se puede confundir con shigellosis o con cólera, adicionalmente se ha asociado con colitis hemorrágica, y síndrome urémico hemolítico por la producción de una tóxina especial llamada verotoxina. Otras especies pueden ser utilizada de esta familia tales como Enterobacter sp., Klebsiella sp., Proteus sp., u otros como se considera anteriormente pueden utilizarse siempre que se ajusten a las necesidades de la compañía y también según el historial del producto (23).

3.13.3 Bacilos Gram Negativo No fermentadores: Un microorganismo sumamente patógeno es Pseudomonas aeruginosa puede causar infección en plantas, insectos, aves, peces y mamíferos. Causante de infecciones y septicemias severas así como de infecciones nosocomiales, se ha caracterizado una variedad mucoide que coloniza el tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística. Es el tercer microorganismo más frecuentemente aislado en pacientes con neumonia. Está bien adaptada para subsistir en ambientes hostiles y con mínimos nutrientes orgánicos. Su virulencia esta relacionada con la producción de enzimas extracelulares que incluyen proteasas, elastasas, y pigmentos que inhiben el crecimiento de otras bacterias, tales como hemolisinas y piocinas.

Hay cepas que producen exotoxina A, la cual inhibe la síntesis de proteínas tal como lo hace la tóxina de Corinebacterium diphtheriae (23).

3.13.4 Levaduras: Candida albicans es el agente etiológico más frecuente aislado de infecciones oportunistas, es parte de la microbiota normal endógena, por lo que se cree que la infección por esta es de origen endógeno. Son responsables de muchas infecciones tales como paroniquia, onicomicosis, vulvovaginitis, enfermedad pulmonar, infección ocular, endocarditis, meningitis e infección diseminada. Se presenta comúnmente aislada de pacientes con SIDA (23).

3.13.5 Mohos: Aspergillus niger uno de los muchos mohos filamentosos usualmente causantes del deterioro de los productos preservados puede encontrarse en el suelo, plantas, aire, superficies de trabajo, baños, etc., y se le asocia a infección en pacientes inmunocomprometidos.

Su presencia denota mala limpieza, y contacto del producto con superficies mal sanitizadas o desinfectadas (23).

4. JUSTIFICACION

En Guatemala, existen varios laboratorios nacionales que producen suspensiones antiamebianas, las cuales se prescriben libremente y sin ningún control entre la población guatemalteca. Estos productos farmacéuticos deben cumplir con estrictas normas de control de calidad microbiológica con el fin de que el usuario no perjudique su salud por el uso de productos contaminados.

Debido a que muchos productos farmacéuticos pueden sufrir deterioro bacteriano por múltiples circunstancias, tales como inadecuado control microbiológico, inadecuado sistema de preservantes, interacción de activos, temperatura de almacenaje, inadecuada manufactura, etc.

Se realizó este estudio para conocer la calidad microbiológica de estos productos e informarle al consumidor la posibilidad de su uso sin riesgo.

5. OBJETIVOS

- 5.1 Establecer si el preservante o sistema de preservantes empleados en la elaboración de suspensiones antiamebinas elaboradas en Guatemala, cumplen con su eficacia, por medio de la prueba de Eficacia de preservantes antimicrobianos, descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos, USP XXII.

- 5.2 Conocer la calidad microbiológica de los productos elaborados por los laboratorios nacionales, y comparar los resultados obtenidos con las Normas Obligatorias Guatemaltecas, COGUANOR.

6. HIPOTESIS

Los preservantes antimicrobianos utilizados en las formulaciones de suspensiones antiamebianas, elaborados en la industria farmacéutica guatemalteca, protegen al producto de la contaminación por Aspergillus niger ATCC 16404, Candida albicans ATCC 10231, Escherichia coli ATCC 8739, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, y Staphylococcus aureus ATCC 6538, según la prueba de Evaluación de la eficacia de preservantes antimicrobinos, descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos, USP XXII.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de Trabajo

Diferentes marcas comerciales de suspensiones antiamebianas, de diferentes lotes tratando de abarcar varios puntos del comercio tales como farmacias, droguerías, etc. Las determinaciones se realizaron por cuatruplicado. Las suspensiones analizadas contuvieron los principios activos, metronidazol, diyodohidroxiquinoleína y tinidazol.

7.2 Medios

7.2.1 Recursos Humanos

-Br. Guillermo Solórzano Gándara, autor.

-Licda. Karin Herrera, asesor.

7.2.2 Recursos institucionales

-Laboratorio de control de calidad microbiológico del departamento de Garantía de calidad de Laboratorios Laprin S.A.

7.2.3 Recursos materiales

7.2.3.1 Cepas de:

Aspergillus niger ATCC 16404

Candida albicans ATCC 10231

Escherichia coli ATCC 8739

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Staphylococcus aureus ATCC 6538

7.2.3.2 Medios de cultivo y reactivos

Agar Tripticasa Soya (TSA)

Agar Saboraud-Dextrosa (SAB)

Tween 80

Solución salina estéril

7.2.3.3 Equipo:

Campana de flujo laminar

7.3.2 La concentración de mohos y levaduras viables es igual o

Incubadora para bacterias

Mechero bunsen

Autoclave

7.3.3 La concentración de cada microorganismo testigo debe

Espectofotómetro

Contador de colonias

Estufa

Cajas de petri

7.4 Procedimiento

Pipetas graduadas

Se realizó un conteo aeróbico en placa para la determinación de

Erlenmeyers

Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml), según lo
considerado en el inciso 7.3.

Frascos de vidrio de boca ancha estériles

Tubos de ensayo

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado, realizándose

Asas de nicromo

controles internos para determinar la reproducibilidad de los
resultados.

7.3 Método de recolección de datos

7.4.1 Conteo aeróbico en placa: Bacterias

La interpretación de los resultados se basa en:

Se estableció el número de Unidades Formadoras de Colonia por

7.3.1 La reducción de bacterias viables en un 0.1 por ciento de

mililitro (UFC/ml) de cada muestra de suspensión obtenida, y sólo las

que se encontraron dentro de los límites permitidos fueron sometidas

las muestras; efectuando un conteo aeróbico en placa.

al análisis (6).

Para este conteo se diluyeron 10 ml de suspensión en 90 ml de agua

peptonada para hacer una dilución 1:10; 1 ml de esta dilución se vertió

por el método de vertido en placa con 20 ml de agar Tripticasa Soya a

una temperatura de 50 °C; se dejó solidificar y luego se incubaron por

48 horas a 37 °C. Al finalizar este período se realizó el conteo de

Unidades Formadoras de Colonias presentes estableciéndose luego el

número de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) (6).

7.4.2 Conteo aeróbico en placa: Mohos y levaduras

Se estableció el número de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) de cada muestra de suspensión obtenida y sólo las que estuvieron dentro de los límites permitidos fueron sometidas al análisis (6).

Para este conteo se diluyeron 10 ml de suspensión en 90 ml de agua peptonada para hacer una dilución 1:10; 1 ml de esta dilución se vertió por el método de vertido en placa con 20 ml de agar Saboraud-Dextrosa, a una temperatura de 50 °C; se dejó solidificar y luego se incubó por 48 horas a temperatura ambiente en el caso de las levaduras y por siete días a temperatura ambiente en el caso de los mohos. Al finalizar este período se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias presentes estableciéndose luego; el número de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) (6).

7.5 Preparación del ensayo

Se preparará un inóculo de las bacterias Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Staphylococcus aureus; se sembró de las cepas stock, en el medio Tripticasa Soya Agar y luego fueron incubadas por 48 horas a 37 °C.

Una vez hubo crecimiento vigoroso se obtuvo por medio de pasar una asada del cultivo a un tubo con solución salina estéril, una solución de cada microorganismo que en una longitud de onda de 580 nm, se tuviera una lectura de 25 % de transmitancia (6).

De esta solución se hizo una dilución 1:100,000 con solución salina estéril, a la que luego se le determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml), por el método de conteo

aeróbico en placa anteriormente descrito; ésta se constituyó en la solución que contenía el inóculo inicial (6).

Se preparó un inóculo de Candida albicans sembrando de la cepa stock, en el medio Saboraud-dextrosa Agar, y luego fue incubado por 48 horas a temperatura ambiente. Una vez hubo crecimiento vigoroso se procedió a obtener por medio de pasar una asada del cultivo a un tubo con solución salina estéril, una solución de este microorganismo que en una longitud de onda de 580 nm, se tuviera una lectura de 25 % de transmitancia (6).

De esta solución se hizo una dilución 1:100,000 con solución salina estéril, a la que luego se le determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml), por el método de conteo aeróbico en placa anteriormente descrito la cual se constituyó en la solución que contenía el inóculo inicial (6).

Se preparó un inóculo de Aspergillus niger sembrando de la cepa stock, en el medio Saboraud-dextrosa Agar, y luego fue incubado por siete días a temperatura ambiente. Una vez obtenido crecimiento vigoroso se procedió a obtener por medio de pasar una asada del cultivo a un tubo con solución salina estéril que contuvo 0.5 % de tween 80, una solución de este microorganismo que en una longitud de onda de 580 nm, se obtuviera una lectura de 25 % de transmitancia (6).

De esta solución se hizo una dilución 1:100,000 con solución salina estéril, a la que luego se le determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) por el método de conteo aeróbico en placa anteriormente descrito; esta se constituyó en la solución que contenía el inóculo inicial (6).

7.6 Evaluación de preservantes en las suspensiones

Se transfirieron 20 ml de cada suspensión a evaluar a cinco frascos de boca ancha, los cuales fueron inoculados con 0.20 ml de la solución que contenía el inóculo inicial de cada microorganismo (6).

Luego por el método de conteo aeróbico en placa, se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonia por mililitro de cada microorganismo, presente en cada frasco, a los 7, 14, 21 y 28 días de la inoculación (6).

Se tuvo un blanco de solución salina, para establecer la viabilidad de los microorganismos durante la prueba (6).

7.7 Interpretación de resultados

Se interpretó el preservante como efectivo cuando:

7.7.1 La concentración de bacterias viables se redujó en un 0.1 por ciento de la concentración inicial, al día 14 de incubación.

7.7.2 La concentración de mohos y levaduras viables fue igual o estuvo por debajo de la concentración inicial.

7.7.3 La concentración de cada microorganismo de prueba permaneció igual o por debajo de la concentración inicial a los 28 días.

7.8 Diseño de la investigación

Se realizó un muestreo por conveniencia, debido a la imposibilidad de saber cuántos lotes se producen al año de cada suspensión en cada industria farmacéutica; y por limitaciones económicas de comprar una cantidad grande de muestras de las farmacias, así como de procesarlas en la infraestructura del laboratorio.

Este estudio es netamente descriptivo por lo que se consideró un

número de treinta muestras seleccionadas al azar y en relación de proporción de acuerdo a marcas existentes, como se menciona anteriormente. Se efectuó un análisis de resultados en base a estadística descriptiva.

8. RESULTADOS

Del total de muestras analizadas veinte (67 %) correspondieron a suspensiones de metronidazol, nueve (30 %) correspondieron a suspensiones de diyohidroxiquinoleína, y 1 (3 %) correspondió a suspensión de tinidazol (anexo 6, gráfica no 1).

Se obtuvo un conteo aeróbico en placa inicial de < 10 UFC/ml para bacterias, mohos y levaduras en todas las suspensiones antiamebianas, Las suspensiones numeradas del 1 al 20 corresponden a suspensiones de metronidazol, del 21 al 29 corresponden a suspensiones de diyohidroxiquinoleína, y la número 30, a suspensión de tinidazol (anexo 5, tabla no 1).

Se utilizó un inóculo promedio de 3.96×10^7 UFC/ml (anexo 5, tabla no. 2) y se interpretó el preservante o sistema de preservantes como eficaz, cuando en un lapso de 14 días de incubación se redujo este inóculo en un 0.1 por ciento, midiéndose através de un conteo de Unidades Formadoras de colonias por mililitro en un lapso de 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Se obtuvo una reducción total del inóculo de Aspergillus niger ATCC 16404, Candida albicans ATCC 10231, Escherichia coli ATCC 8739 y Staphylococcus aureus ATCC 6538; por la obtención de conteos de < 10 UFC/ml, a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación en todas las muestras analizadas (anexo 5 tablas no. 3, 4, 5 y 7 y anexo 6, gráficas 2, 3, 4, y 7.)

Se obtuvo una reducción total del inóculo de Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, en el 100 por ciento de las suspensiones de metronidazol y de tinidazol, (anexo 6, gráfica no. 5), a los siete días de incubación, no siendo así en dos suspensiones de diyohidroxiquinoleína,

presentando ~~consecu~~ a los ~~...~~

totalmente, hasta el día 21 de incubación (anexo 5, tabla no. 6 y anexo 6, gráfica no. 6).

En las 30 muestras analizadas se consideró que el preservante o el sistema de preservantes empleados en la elaboración de suspensiones antiamebianas es eficaz, ya que al día 14 de incubación se obtuvo una reducción del 99.9 por ciento del inóculo inicial utilizado.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Del total del análisis efectuados a 30 muestras de suspensiones antiamebianas se obtuvo resultados de < 10 UFC/ml, inicialmente, lo que significa un resultado favorable ya que en cierta manera representa la forma en que se está trabajando en las industrias farmacéuticas nacionales, estos resultados cumplen con las especificaciones descritas en la norma COGUANOR NGO 6 0 44, Para preparaciones orales que contienen antibióticos.

Se obtuvo una reducción total del inóculo en el caso de Aspergillus niger ATCC 16404, Candida albicans ATCC 10231, Escherichia coli ATCC 8739 y Staphylococcus aureus ATCC 6538 en todas las muestras analizadas lo que evidencia la capacidad que tiene el preservante o sistema de preservantes empleados en la formulación del producto, para resistir una contaminación ya sea durante su proceso de manufactura, o como resultado del mal uso que pueda hacerse de él por parte del usuario. No se pudo, por limitaciones prácticas establecer la cantidad de preservantes que le son agregados al producto, aunque si se conoce un límite máximo permitido en que cada preservante debe de ser agregado (ver anexo no. 3). Esta cantidad aparece en las etiquetas pero hay variaciones por efecto de formulación entre cada lote producido, por lo que no es exacta.

Es importante señalar que un preservante se agrega para reducir una contaminación inicial eventual y para asegurar la estabilidad de una fórmula, se debe conocer entonces las concentraciones de los mismos, ya que resultados como el presente, podrían indicar en cierta forma el uso de preservantes en exceso.

En el caso de Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, se obtuo

resultados de cultivos positivos a los 7 y 14 días de la inoculación, lo que representa la susceptibilidad del producto a contaminarse, demostrando que sin el seguimiento de las Buenas prácticas de Manufactura puede haber contaminación del producto, y en ese estado puede llegar a las manos del consumidor. La mayoría de suspensiones consideradas en el presente estudio tuvieron una fecha de dos años de vencimiento a partir de la fecha de producción, se puede considerar que un producto cerca de la fecha de vencimiento es más susceptible de sufrir una contaminación en todo caso externa, debido a cambios estructurales en la estabilidad de su fórmula; Debido a esa razón, muchas empresas adjudican una fecha de vencimiento más corta para tener un límite de seguridad, que es demostrado por estudios de estabilidad. De esa forma al hacerse uso del producto cerca de su fecha de vencimiento, o utilizarse en un análisis se tiene cierto grado de seguridad y estabilidad.

Debido al preservante o sistema de preservantes empleados que se utilizan en la formulación de este producto se obtuvo una reducción total del inóculo en el día 21 de incubación, obteniéndose resultados de $< 10 \text{ UFC/ml}$, y debido que al día 14 de incubación se obtuvo una reducción mayor del 99.9 por ciento del inóculo inicial se considera al preservante como eficaz.

Sería importante evaluar la capacidad que tiene el principio activo farmacéutico como capaz de actuar como preservante por sí solo, paralelamente a la capacidad que tienen varias cepas de microorganismos de desarrollar resistencia antibiótica.

10. CONCLUSIONES

10.1 El preservante o sistema de preservantes empleados en la formulación de las muestras de suspensiones antiamebianas analizadas en el presente estudio, Elaboradas por la industria farmacéutica Guatemalteca, son eficaces de acuerdo a la prueba de Eficacia de Preservantes Antimicrobianos descrita en la Farmacopea de los Estados Unidos, USP XXII

10.2 Las Suspensiones antiamebianas, de distintas marcas comerciales analizadas en el presente estudio, elaboradas por la industria farmaceutica Guatemalteca, cumplen con las normas microbiológicas guatemaltecas obligatorias.

11 RECOMENDACIONES

- 11.1 A las autoridades de Control de Calidad de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) y la Dirección General de Servicios de Salud: (DGSS), Supervisar el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura por parte de las industrias farmacéuticas nacionales, así como exigir estudios como el presente que aseguren la calidad con que sus productos son elaborados.
- 11.2 Exhortar a las industrias farmacéuticas nacionales, a que continuen superándose en la búsqueda de la excelencia del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura. Ya que resultados positivos como el presente no significan el estancamiento en el proceso de manufactura, sino velar por el seguimiento de los procesos de manufactura, con el resultado de fabricar productos excelentes.

12. REFERENCIAS

1. OPS\OMS, Boletín especial de la Oficina Sanitaria Panamericana, vol. III, no. 7, Septiembre 1992. 56 p.
2. Cowen RA. Antimicrobial activity, a critical review of test methods of preservative efficiency. J Soc Cosm Chem 1967;27: 467-481 p.
3. Brown HA. Basic and clinical parasitology. 5th ed. USA: Lippicott publishing, co. 1988. 238 p.
4. Rossentein E. Diccionario de Especialidades farmacéuticas PLM. 23a ed. Colombia: Editorial para los Médicos S.A., 1992. 1128 p.
5. The American Hospital Formulary Service, AHFS. 1992 USA: American Society of Hospital Pharmacists. 2363 p.
6. The United States Pharmacopeial Convention Inc. The United States Pharmacopeia, The National Formulary. USP XXII. 1990, 1256 p.
7. Productos Farmacéuticos registrados en Guatemala, ordenados según grupo terapéutico, División de Control de Medicamentos y Alimentos. (CEGIMED) Doc. Tec. 1992. 32 p.
8. Moral J. Cosmetic Microbiology, New Ingredients, New preservation strategies. Cosm & Toil 1992; 107:65-72
9. Orth DS. Mycrobiological considerations in the developing of new cosmetics formulatios. Cosm formulatios. Cosm & Toil 1989;104(2):29-40

10. Orth DS. Preservative efficacy testing of cosmetics products.
Cosm & Toil 1981;97:62-65
11. Association of Official Analytical Chemist. FDA.
Bacteriological Analytical Manual. 6 ed. Whashington 1984.
XXIV-21
12. Chan M, Bruce H. A rapid screening test for raning
preservative efficacy. D & CI. 1981;34-37
13. Gayle KM. A rapid screening methods for preservative
efficiency evaluation. Cosm & Toil 1987; 102:47-51
14. Garrett AW. Cosmetics allergens. D & CI 1991; 12-18.
15. Cosmetic Preservatives Encyclopedia. Cosm & Toil
1987; 102:25-38
16. Jackson GJ. Type of closure prevents microbial
contamination of cosmetics during consumer use. Appl
Envir Microbiol 1990; 6:23-26
17. Curry J. Water activity and preservation.
Cosm & Toil 1985; 100 (2):53-56
18. James RA. A rapid screening methods for preservative
efficacy evaluation. Cosm & Toil 1987; 102:47-51
19. Borovian GE. Pseudomonas cepacia , Growth in and
adaptability to increased preservative concentrations.
J Soc Cosm Chem 1983;(4) 34:197-293
20. Nielsen PA, Close JA. Resistence of a strain of
Pseudomanas cepacia to esters of p-hydroxi benzoic acid.
Appl Envir Microbiol 1976; 31(5):718-722.

P.

21. Jungerman E. The fate of parabens in a contaminated surfactant product. SCCS 1985(5); 18:982-986
22. NORMA NGO 6 0 44. Productos Farmacéuticos, Límites Microbiológicos. GOBIERNO DE LA REPUBLICA DE GUATEMALA. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). Doc. Tec. 7p.
23. Bayley & Scotts. Diagnostic Microbiology. 8th ed.
USA: The C.V. Mosby Company. 1990. 861 p.
24. Willing HS. Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals.
USA: Marcel Dekker, Inc. 1992. 259 p.

13. ANEXOS

ANEXO No. 1

Productos Farmacéuticos

Límites Microbiológicos (22)

categoria	forma farmacéutica	requerimientos
1	Inyectables	Esterilidad
2	Preparaciones Oftálmicas	Esterilidad
3	Preparaciones para aplicación tópica especial, y para aplicar en cavidades corporales normalmente libres de microorganismos. Preparaciones orales que contienen antibióticos	Ausencia de microorganismos viables en un gramo o un mililitro de producto

3	Preparaciones tópicas de alto riesgo de contaminación	No más de 100 microorganismos viables en un gramo o mililitro. no deben estar presentes: Enterobacterias, <u>P. aeruginosa</u> <u>S. aureus</u>
---	---	--

4	Preparaciones para uso oral, y otras preparaciones que no contienen antibióticos	No más de 1000 bacterias en un gramo o mililitro no más de 100 hongos y levaduras en un gramo o mililitro Ausencia de Enterobacterias y <u>P. aeruginosa</u> en un gramo o mililitro
---	--	---

ANEXO NO. 2

Procedimiento para la evaluación de la eficacia de preservantes en suspensiones antiamebianas
(6, 22)



ANEXO No. 3

Preservantes más comunmente usados por las Industrias Farmacéuticas (15)

Preservante y [%] utilizada	Espectro de acción	Inactivación	rango de pH óptimo
Alcohol Benzílico 1.0-3.0%	Bacterias	Surfactantes iónicos	> 5
Clorbutanol	Bacterias Mohos	Surfactantes iónicos	> 4
propilenglicol 1.6%	Bacterias Mohos	Temperatura alta	--
Diazolidinil Urea (germal II) 0.03-0.3%	Gram negativo	--	3-9
Formaldehido 0.05-0.2%	amplio espectro	Gelatina, Proteínas	3-10
DMDM-Hydantoína 0.15-0.4%	Amplio, no para levaduras	---	3-9
Glutaral 0.02-0.2% (de una solución al 50%)	Amplio espectro	Amonio, pH basicos	< 8

...cont

Preservantes más comunmente usados por las Industrias Farmacéuticas (15)

Preservante y [] utilizada	Espectro de acción	Inactivación	rango de pH óptimo
Imidazolidinil Urea (Germal 115) 0.05-0.5%	Amplio espectro	---	3-9
Acido bórico 0.01-1.0%	Levaduras	alcális, carbonatos, hidroxidos	3-7
metil, cloro isothiazolinona 0.02-0.1%	Bacterias mohos y levaduras	Aminas, sulfi tos, reductores	1-9
Sorbato de potasio 0.025-0.2%	Mohos y Levaduras	Surfactantes no iónicos	< 6.5
Acido sorbico 0.1-0.30%	Mohos, levaduras	Emulsión agua aceite	2.5-6.0
Parabenos hasta 0.3%	mohos y levaduras Gram positivo	Emulsiones agua aceite	3.8-8.0
Cloruro de Benzalconio 0.1-0.3%	Gram positivo Gram negativo	Surfactantes aniónicos	---
Digluconato de clorohexidina 0.01-0.1%	Bacterias	Surfactantes aniónicos	5-8

ANEXO No. 4

Definición de Buenas Prácticas de Manufactura

Por Buenas Prácticas de Manufactura, se entiende todo el conjunto de procesos que tienden a asegurar la calidad del producto terminado. Comprendiendo desde la utilización de todos los insumos para su manufactura en la planta farmacéutica, hasta que llega a las manos del consumidor.

Así podemos mencionar: actuales y validadas prácticas de manufactura, así como regulaciones y especificaciones; producto terminado, organización del personal, condiciones de trabajo, edificios y facilidades, control de equipo, controles de procesos de producción, controles de limpieza, higiene y sanitización, control de etiquetado y empaque, distribución y almacenamiento seguro del producto, controles de laboratorio, historiales y reportes, control de productos devueltos, destruidos o vencidos, control de reempacado y reetiquetado, así como control de sustancias controladas; auditorias, inspecciones etc.

14. ANEXO 5, TABLAS

TABLA No. 1

RECuento AEROBICO TOTAL INICIAL
SUSPENSIONES ANTIAMEBIANAS, UFC/ml *

Suspensión No.	Bacterias	mohos y levaduras
1	< 10	< 10
2	< 10	< 10
3	< 10	< 10
4	< 10	< 10
5	< 10	< 10
6	< 10	< 10
7	< 10	< 10
8	< 10	< 10
9	< 10	< 10
10	< 10	< 10
11	< 10	< 10
12	< 10	< 10
13	< 10	< 10
14	< 10	< 10
15	< 10	< 10
16	< 10	< 10
17	< 10	< 10
18	< 10	< 10
19	< 10	< 10
20	< 10	< 10
21	< 10	< 10
22	< 10	< 10
23	< 10	< 10
24	< 10	< 10
25	< 10	< 10
26	< 10	< 10
27	< 10	< 10
28	< 10	< 10
29	< 10	< 10
30	< 10	< 10

* Unidades formadoras de Colonia por ml de producto analizado.

TABLA No. 2

RECuento AEROBICO TOTAL INICIAL
DEL INOCULO UTILIZADO, UFC/ml

Microorganismo	dilución	conteo UFC/ml
<u>Aspergillus niger</u> ATCC 16404	1:100,000	5.8 x 10 ⁷
<u>Candida albicans</u> ATCC 10231	1:100,000	3.2 x 10 ⁷
<u>Escherichia coli</u> ATCC 8739	1:100,000	4.0 x 10 ⁷
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> ATCC 9027	1:100,000	2.9 x 10 ⁷
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538	1:100,000	3.9 x 10 ⁷

X +/- DS 3.69 X 10⁷ +/- 1.13 X 10⁷

TABLA No. 3

RECuento AEROBICO EN PLACA DE *A. niger* ATCC 16404
 EN SUSPENSIONES ANTIAMEBIANAS DURANTE LA PRUEBA DE
 EFICACIA DE PRESERVANTES ANTIMICROBIANOS, UFC/ml.

Días	7	14	21	28
1	< 10	< 10	< 10	< 10
2	< 10	< 10	< 10	< 10
3	< 10	< 10	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10	< 10
6	< 10	< 10	< 10	< 10
7	< 10	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10	< 10
9	< 10	< 10	< 10	< 10
10	< 10	< 10	< 10	< 10
11	< 10	< 10	< 10	< 10
12	< 10	< 10	< 10	< 10
13	< 10	< 10	< 10	< 10
14	< 10	< 10	< 10	< 10
15	< 10	< 10	< 10	< 10
16	< 10	< 10	< 10	< 10
17	< 10	< 10	< 10	< 10
18	< 10	< 10	< 10	< 10
19	< 10	< 10	< 10	< 10
20	< 10	< 10	< 10	< 10
21	< 10	< 10	< 10	< 10
22	< 10	< 10	< 10	< 10
23	< 10	< 10	< 10	< 10
24	< 10	< 10	< 10	< 10
25	< 10	< 10	< 10	< 10
26	< 10	< 10	< 10	< 10
27	< 10	< 10	< 10	< 10
28	< 10	< 10	< 10	< 10
29	< 10	< 10	< 10	< 10
30	< 10	< 10	< 10	< 10

* Unidades formadoras de Colonia por ml de producto analizado.

TABLA No. 4

RECUESTO AEROBICO EN PLACA DE *C. albicans* ATCC 10231
 EN SUSPENSIONES ANTIAMEBIANAS DURANTE LA PRUEBA DE
 EFICACIA DE PRESERVANTES ANTIMICROBIANOS, UFC/ml.

Días	7	14	21	28
1	< 10	< 10	< 10	< 10
2	< 10	< 10	< 10	< 10
3	< 10	< 10	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10	< 10
6	< 10	< 10	< 10	< 10
7	< 10	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10	< 10
9	< 10	< 10	< 10	< 10
10	< 10	< 10	< 10	< 10
11	< 10	< 10	< 10	< 10
12	< 10	< 10	< 10	< 10
13	< 10	< 10	< 10	< 10
14	< 10	< 10	< 10	< 10
15	< 10	< 10	< 10	< 10
16	< 10	< 10	< 10	< 10
17	< 10	< 10	< 10	< 10
18	< 10	< 10	< 10	< 10
19	< 10	< 10	< 10	< 10
20	< 10	< 10	< 10	< 10
21	< 10	< 10	< 10	< 10
22	< 10	< 10	< 10	< 10
23	< 10	< 10	< 10	< 10
24	< 10	< 10	< 10	< 10
25	< 10	< 10	< 10	< 10
26	< 10	< 10	< 10	< 10
27	< 10	< 10	< 10	< 10
28	< 10	< 10	< 10	< 10
29	< 10	< 10	< 10	< 10
30	< 10	< 10	< 10	< 10

* Unidades formadoras de Colonia por ml de producto
 analizado.

TABLA No. 5

RECUESTO AEROBICO EN PLACA DE E. coli ATCC 8739
 EN SUSPENSIONES ANTIAMEBIANAS DURANTE LA PRUEBA DE
 EFICACIA DE PRESERVANTES ANTIMICROBIANOS, UFC/ml.

Días	7	14	21	28
1	< 10	< 10	< 10	< 10
2	< 10	< 10	< 10	< 10
3	< 10	< 10	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10	< 10
6	< 10	< 10	< 10	< 10
7	< 10	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10	< 10
9	< 10	< 10	< 10	< 10
10	< 10	< 10	< 10	< 10
11	< 10	< 10	< 10	< 10
12	< 10	< 10	< 10	< 10
13	< 10	< 10	< 10	< 10
14	< 10	< 10	< 10	< 10
15	< 10	< 10	< 10	< 10
16	< 10	< 10	< 10	< 10
17	< 10	< 10	< 10	< 10
18	< 10	< 10	< 10	< 10
19	< 10	< 10	< 10	< 10
20	< 10	< 10	< 10	< 10
21	< 10	< 10	< 10	< 10
22	< 10	< 10	< 10	< 10
23	< 10	< 10	< 10	< 10
24	< 10	< 10	< 10	< 10
25	< 10	< 10	< 10	< 10
26	< 10	< 10	< 10	< 10
27	< 10	< 10	< 10	< 10
28	< 10	< 10	< 10	< 10
29	< 10	< 10	< 10	< 10
30	< 10	< 10	< 10	< 10

* Unidades formadoras de Colonia por ml de producto analizado.

TABLA No. 6

RECUESTO AEROBICO EN PLACA DE P. aeruginosa ATCC 9027
 EN SUSPENSIONES ANTIAMEBIANAS DURANTE LA PRUEBA DE
 EFICACIA DE PRESERVANTES ANTIMICROBIANOS, UFC/ml.

Días	7	14	21	28
1	< 10	< 10	< 10	< 10
2	< 10	< 10	< 10	< 10
3	< 10	< 10	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10	< 10
6	< 10	< 10	< 10	< 10
7	< 10	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10	< 10
9	< 10	< 10	< 10	< 10
10	< 10	< 10	< 10	< 10
11	< 10	< 10	< 10	< 10
12	< 10	< 10	< 10	< 10
13	< 10	< 10	< 10	< 10
14	< 10	< 10	< 10	< 10
15	< 10	< 10	< 10	< 10
16	< 10	< 10	< 10	< 10
17	< 10	< 10	< 10	< 10
18	< 10	< 10	< 10	< 10
19	< 10	< 10	< 10	< 10
20	< 10	< 10	< 10	< 10
21	< 10	< 10	< 10	< 10
22	< 10	< 10	< 10	< 10
23	< 10	< 10	< 10	< 10
24	< 10	< 10	< 10	< 10
25	3.8 x 10 ⁴	7.5 x 10 ²	< 10	< 10
26	< 10	< 10	< 10	< 10
27	< 10	< 10	< 10	< 10
28	< 10	< 10	< 10	< 10
29	6.5 x 10 ⁵	5.1 x 10 ³	< 10	< 10
30	< 10	< 10	< 10	< 10

* Unidades formadoras de Colonia por ml de producto analizado.

TABLA No. 7

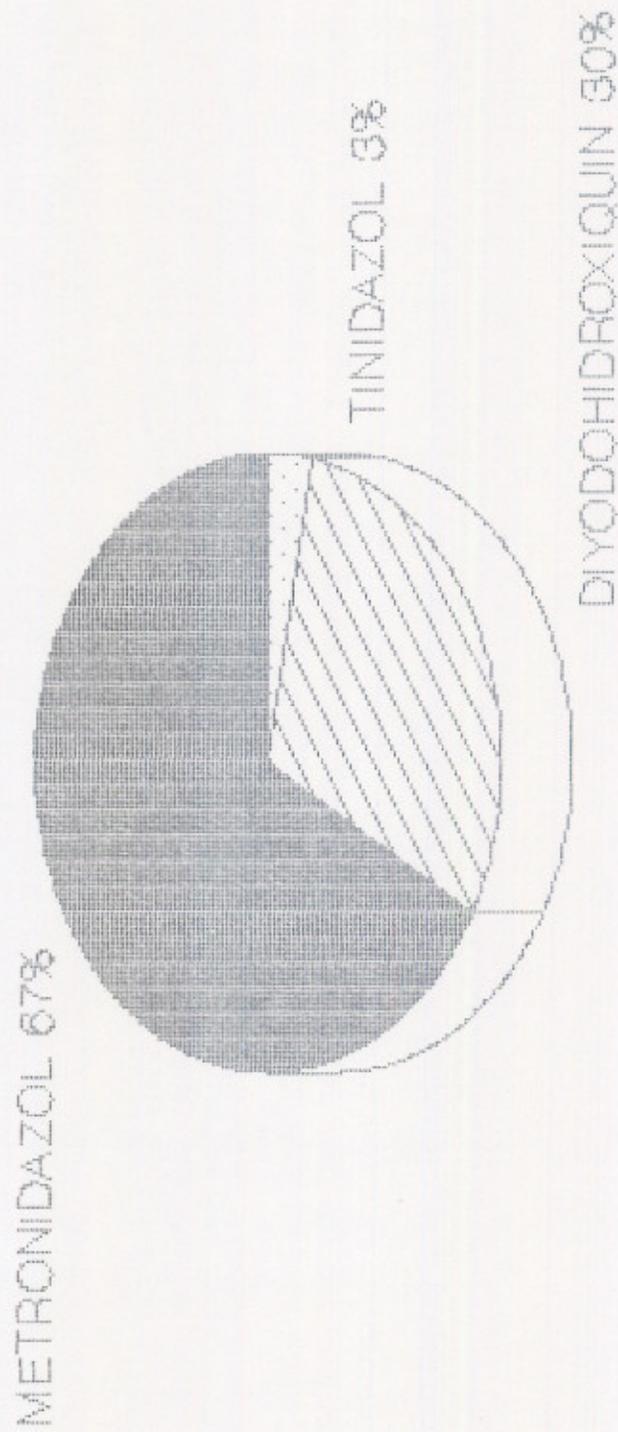
RECuento AEROBICO EN PLACA DE *S. aureus* ATCC 6538
 EN SUSPENSIONES ANTIAMEBIANAS DURANTE LA PRUEBA DE
 EFICACIA DE PRESERVANTES ANTIMICROBIANOS, UFC/ml.

Días	7	14	21	28
1	< 10	< 10	< 10	< 10
2	< 10	< 10	< 10	< 10
3	< 10	< 10	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10	< 10
5	< 10	< 10	< 10	< 10
6	< 10	< 10	< 10	< 10
7	< 10	< 10	< 10	< 10
8	< 10	< 10	< 10	< 10
9	< 10	< 10	< 10	< 10
10	< 10	< 10	< 10	< 10
11	< 10	< 10	< 10	< 10
12	< 10	< 10	< 10	< 10
13	< 10	< 10	< 10	< 10
14	< 10	< 10	< 10	< 10
15	< 10	< 10	< 10	< 10
16	< 10	< 10	< 10	< 10
17	< 10	< 10	< 10	< 10
18	< 10	< 10	< 10	< 10
19	< 10	< 10	< 10	< 10
20	< 10	< 10	< 10	< 10
21	< 10	< 10	< 10	< 10
22	< 10	< 10	< 10	< 10
23	< 10	< 10	< 10	< 10
24	< 10	< 10	< 10	< 10
25	< 10	< 10	< 10	< 10
26	< 10	< 10	< 10	< 10
27	< 10	< 10	< 10	< 10
28	< 10	< 10	< 10	< 10
29	< 10	< 10	< 10	< 10
30	< 10	< 10	< 10	< 10

* Unidades formadoras de Colonia por ml de producto analizado.

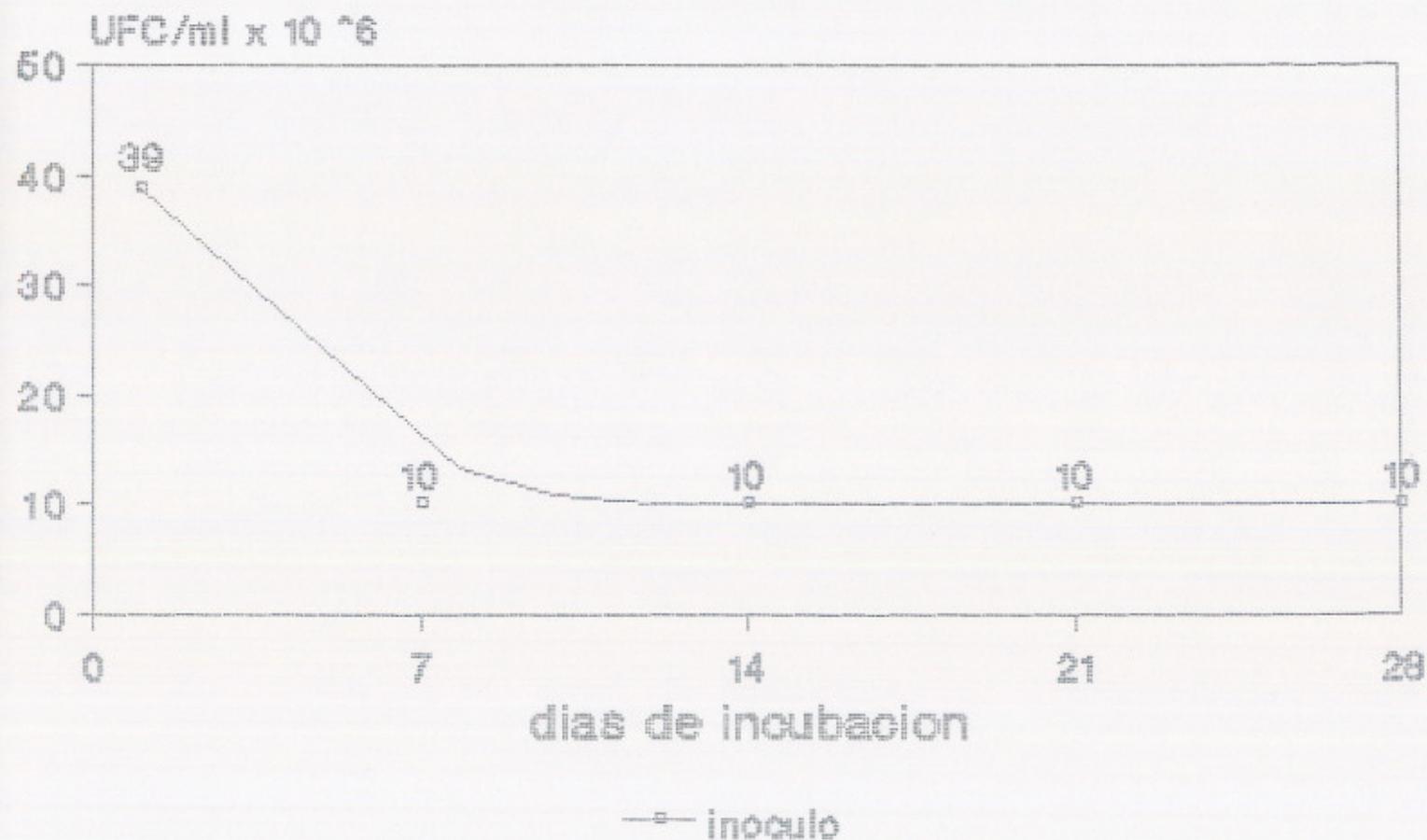
ANEXO 6, GRAFICAS

GRAFICA No. 1
EVALUACION DE PRESERVANTES
DISTRIBUCION POR PRINCIPIO ACTIVO

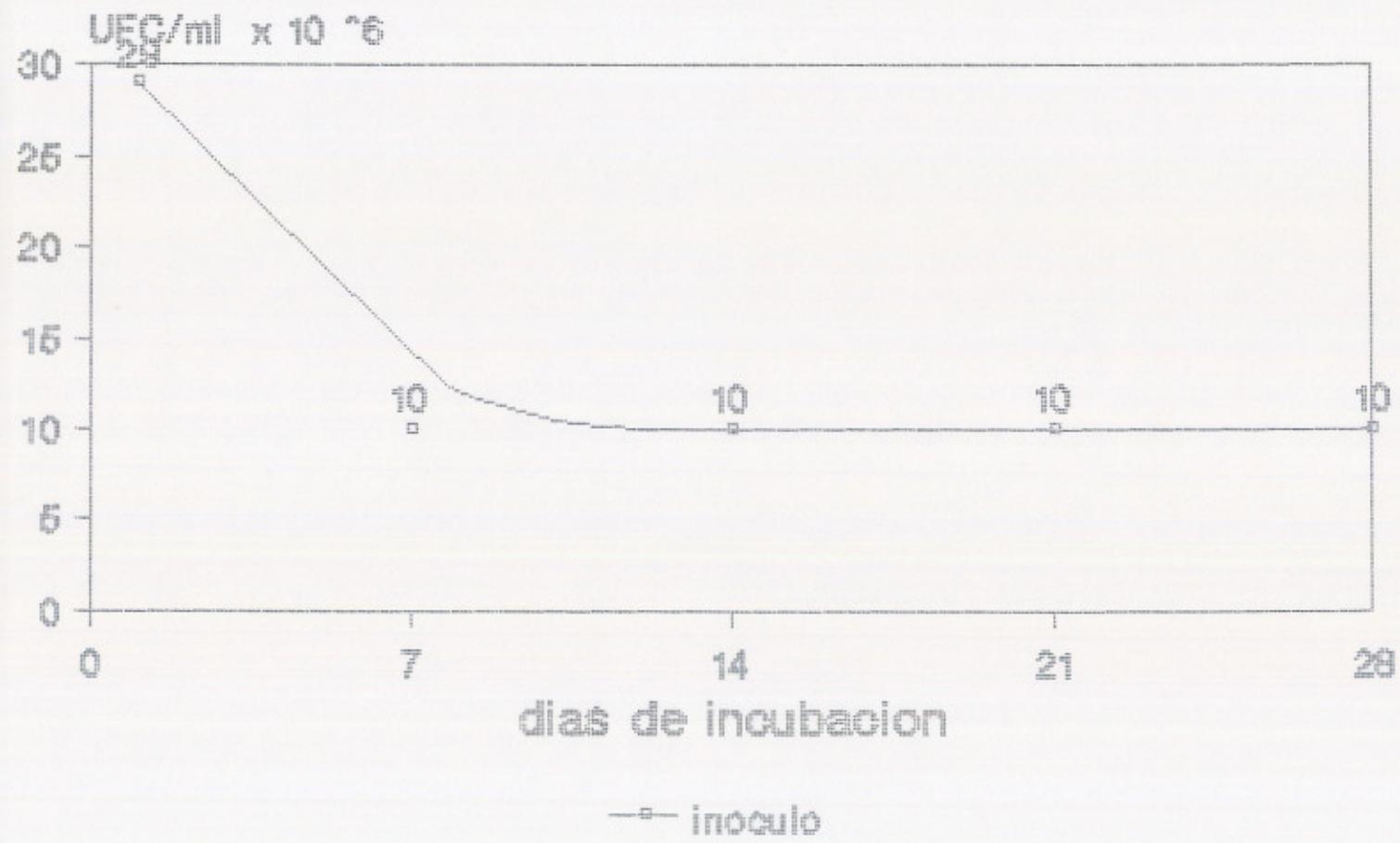


TOTAL 30 MUESTRAS

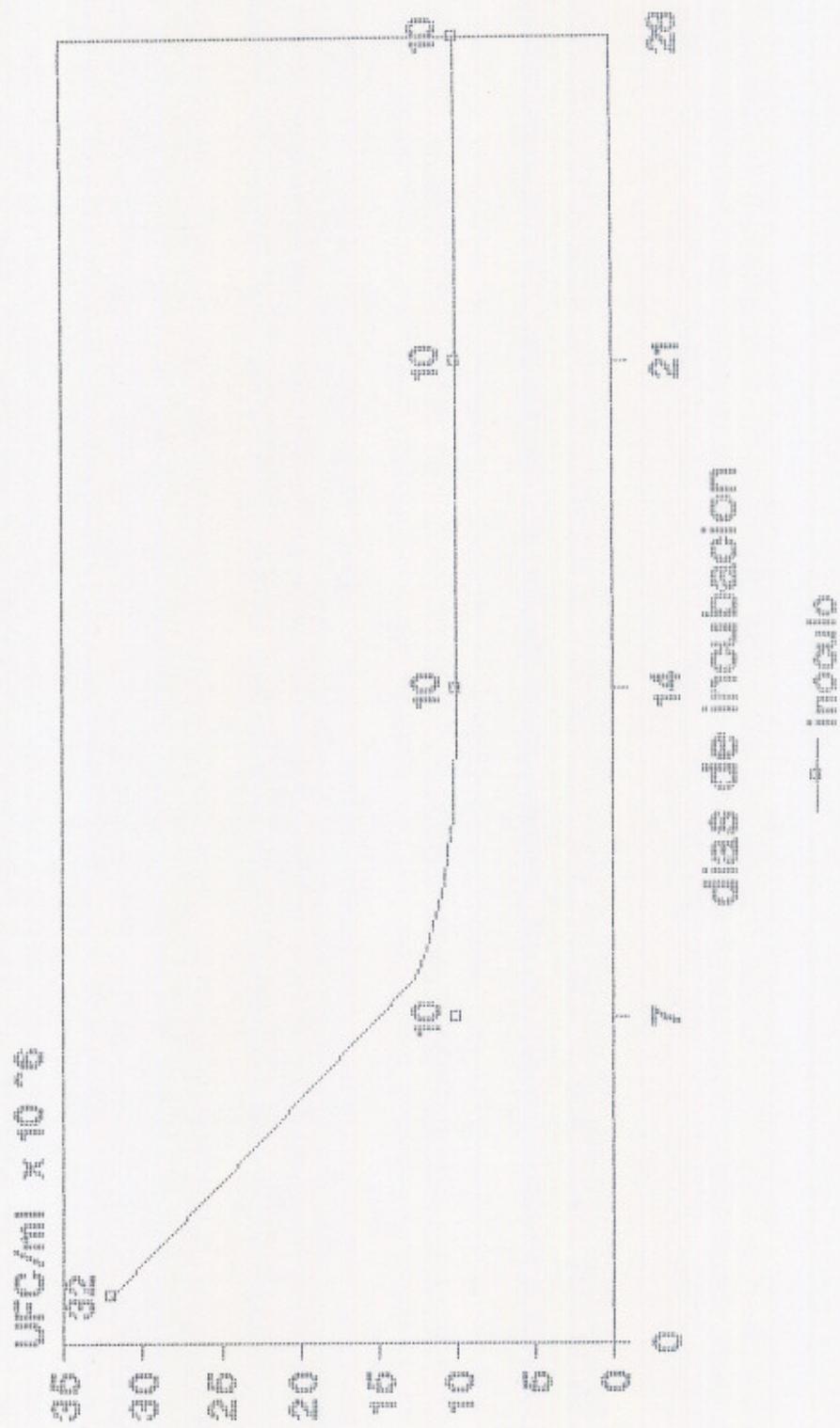
GRAFICA No. 2
EVALUACION DE PRESERVANTES
Recuento de *A. niger* ATCC 16404



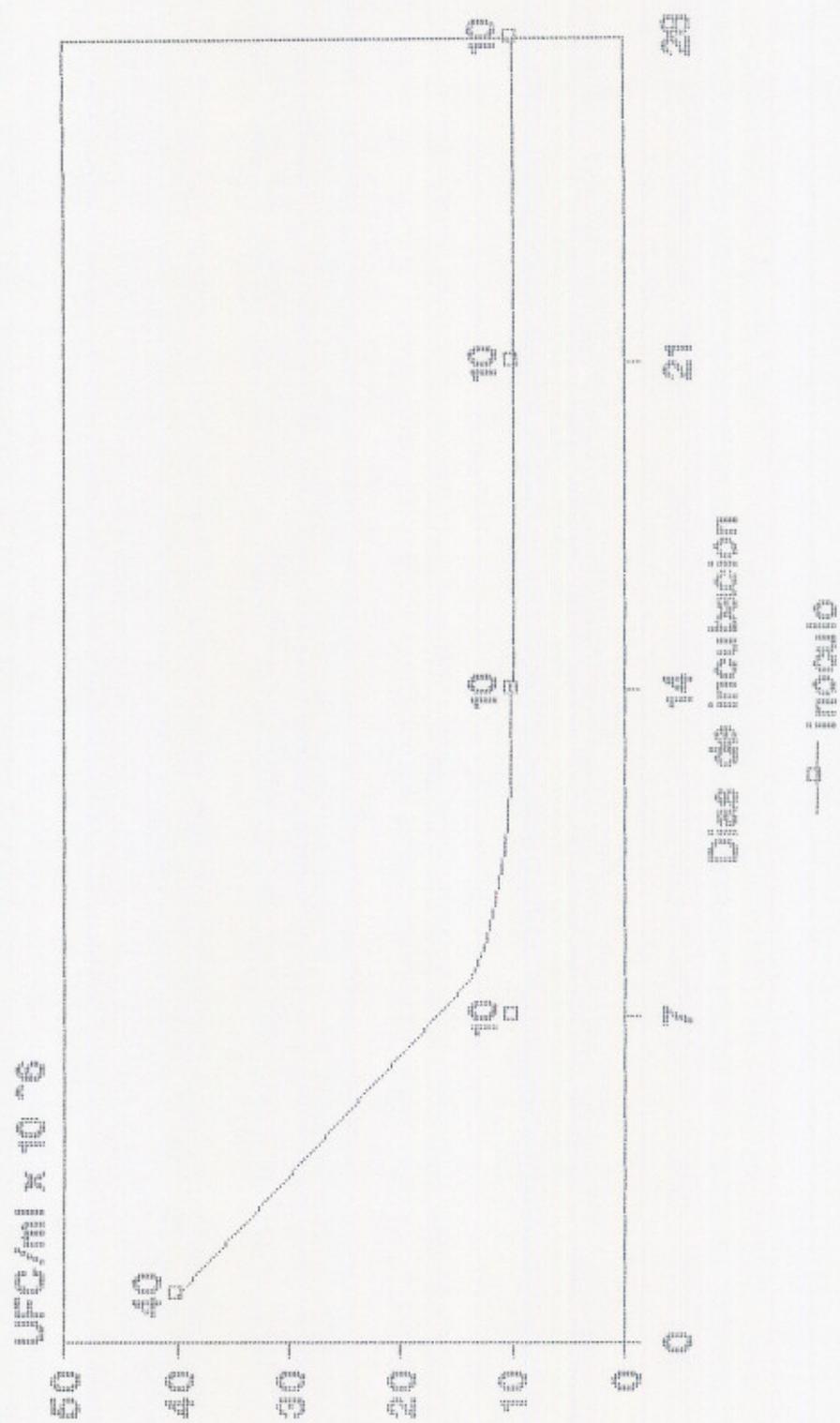
GRAFICA No. 3
EVALUACION DE PRESERVANTES
Recuento de *C. albicans* ATCC 10231



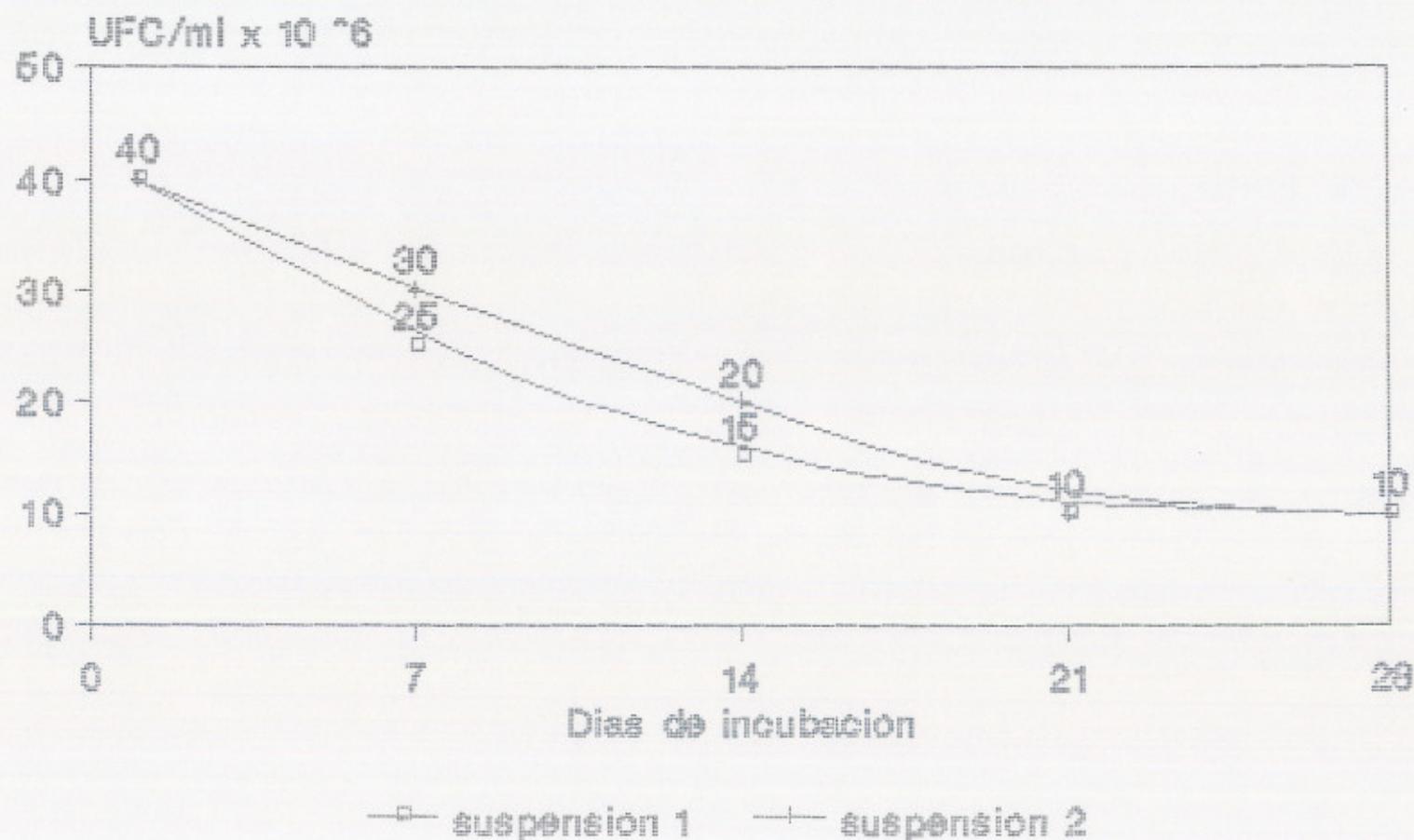
GRAFICA No. 4
EVALUACION DE PRESERVANTES
Recuento de E. coli ATCC 8739



GRAFICA No. 5
EVALUACION DE PRESERVANTES
Recuento de F. aeruginosa ATCC 9027

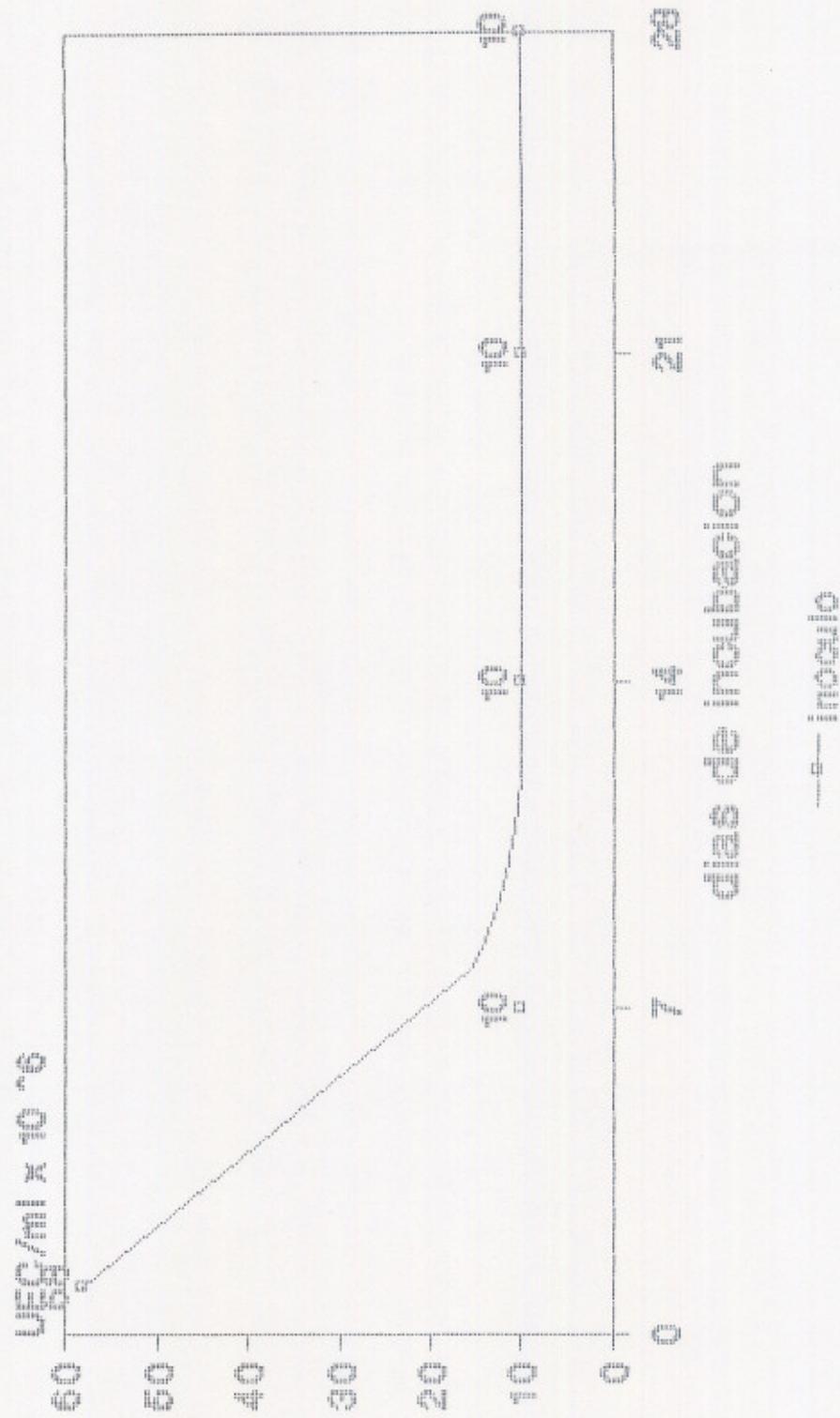


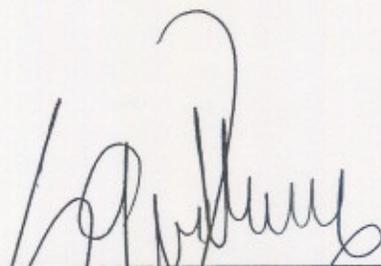
GRAFICA No. 6
EVALUACION DE PRESERVANTES
Recuento de *P. aeruginosa* ATCC 9027



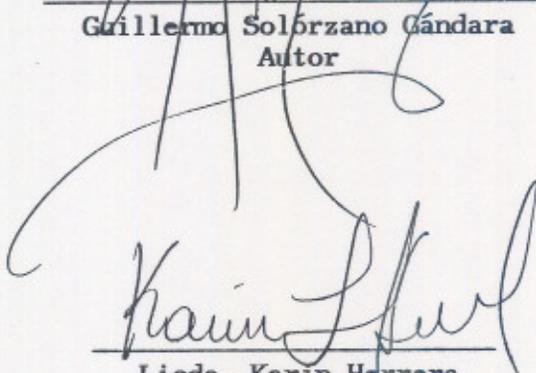
2 suspensiones de diiodoquinoleína

GRAFICA No. 7
EVALUACION DE PRESERVANTES
Recuento de *S. aureus* ATCC 6538





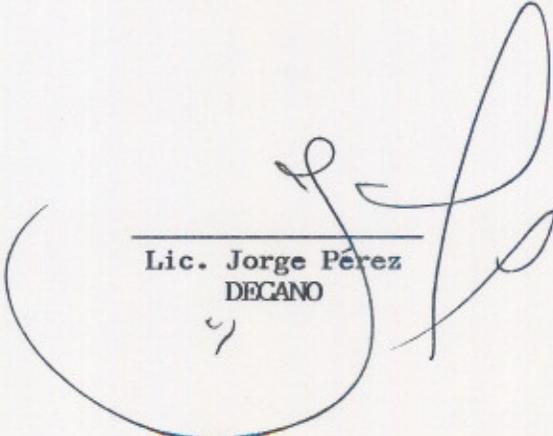
Guillermo Solórzano Cándara
Autor



Licda. Karin Herrera
Asesor



Lic. Gerardo Arroyo
DIRECTOR ESCUELA DE QUIMICA BIOLOGICA



Lic. Jorge Pérez
DECANO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central